

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-090608

(43)Date of publication of application : 10.04.1998

(51)Int.Cl.

G02B 21/18  
G01N 21/64

(21)Application number : 08-246354

(71)Applicant : BUNSHI BIO PHOTONICS KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 18.09.1996

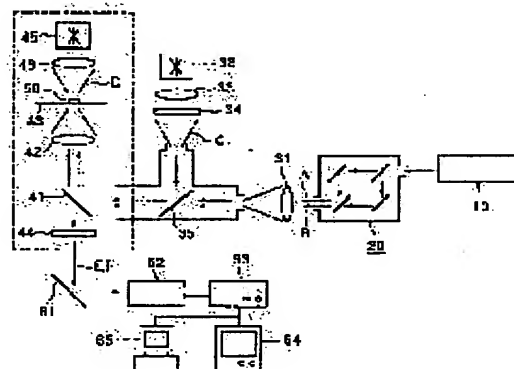
(72)Inventor : HIRANO MASAHIKO  
SUGA TAKAYUKI

## (54) MICROSCOPE DEVICE

## (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a microscope device capable of simultaneously converging and emitting irradiation light on plural parts different from each other on a specimen.

**SOLUTION:** The irradiation light A and B outputted from an irradiating light source 10, branched by a branching optical system 20 and emitted through a condenser lens 31, dichroic mirrors 35 and 41 and the objective lens 42, irradiate simultaneously two points of the specimen 50 existing in a view area of an objective lens 42. Exciting light C outputted from an exciting light source 32 irradiates the specimen 50 through the condenser lens 33 and a band-pass filter, etc. The illumination light D outputted from an illumination light source 45 irradiates the specimen 50 by the condenser lens 46. Fluorescent E and transmission light F generated from the specimen 50 are picked up by a TV camera 62 through the objective lens 42, the dichroic mirror 41, the band-pass filter 44 and a reflection mirror 61 and displayed on a monitor part 64.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

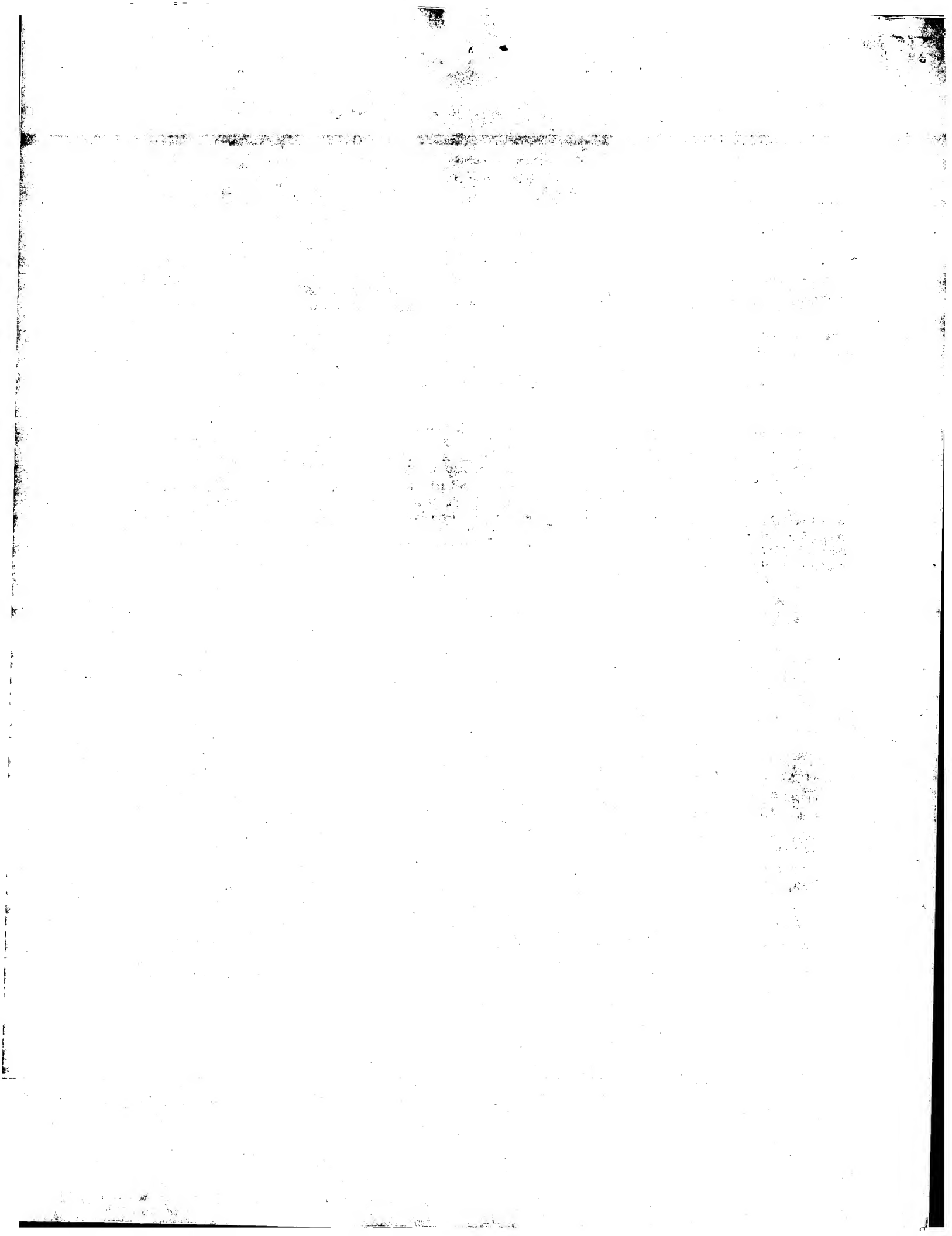
[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-90608

(43) 公開日 平成10年(1998) 4月10日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

G 0 2 B 21/18

G 0 2 B 21/18

G 0 1 N 21/64

G 0 1 N 21/64

E

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平8-246354

(22) 出願日 平成8年(1996) 9月18日

(71) 出願人 595047385

株式会社分子バイオホトニクス研究所  
静岡県浜北市平口5000番地

(72) 発明者 平野 雅彦

静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子  
バイオホトニクス研究所内

(72) 発明者 菅 隆之

静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子  
バイオホトニクス研究所内

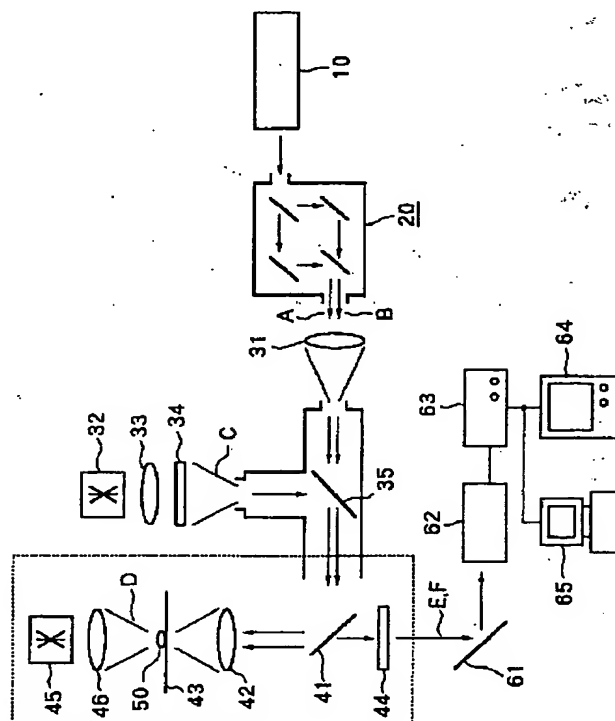
(74) 代理人 弁理士 長谷川 芳樹 (外3名)

(54) 【発明の名称】 顕微鏡装置

(57) 【要約】

【課題】 試料上の互いに異なる複数の部位に照射光を同時に集光照射することができる顕微鏡装置を提供する。

【解決手段】 照射用光源10から出力され分岐光学系20により分岐されて出射した照射光AおよびBは、集光レンズ31、ダイクロイックミラー35および41ならびに対物レンズ42を経て、対物レンズ42の視野領域内にある試料50の2点に同時に照射される。励起用光源32から出力された励起光Cは、集光レンズ33およびバンドパスフィルタ34等を経て、試料50に照射される。照明用光源45から出力された照明光Dは、集光レンズ46により試料50に照射される。試料50から発生した蛍光Eおよび透過光Fは、対物レンズ42、ダイクロイックミラー41、バンドパスフィルタ44および反射鏡61を経て、テレビカメラ62により撮像され、モニタ部64に表示される。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料に照射すべき光束を出力する照射用光源と、  
前記照射用光源から出力された光束を分岐して第1の照射光および第2の照射光を出力する分岐光学系と、  
前記第1および前記第2の照射光それぞれを入力し視野領域内の前記試料上の2点それぞれに集光照射させる対物レンズと、  
前記対物レンズに入射した前記試料からの光像を検出する検出光学系と、  
を備えることを特徴とする顕微鏡装置。

【請求項2】 試料に照射すべき励起光を出力する励起用光源と、前記励起光を前記試料に照射する励起光学系と、を更に備え、  
前記検出光学系は、前記試料から発生した蛍光を検出する、  
ことを特徴とする請求項1記載の顕微鏡装置。

【請求項3】 試料に照射すべき照明光を出力する照明用光源と、前記照明光を前記試料に照射する照明光学系と、を更に備え、  
前記検出光学系は、前記照明光が前記試料に照射されて発生した透過光または散乱光を検出する、  
ことを特徴とする請求項1記載の顕微鏡装置。

【請求項4】 前記試料上の前記第1の照射光の照射位置を調整する第1の照射位置調整手段を更に備える、ことを特徴とする請求項1記載の顕微鏡装置。

【請求項5】 前記試料上の前記第2の照射光の照射位置を調整する第2の照射位置調整手段を更に備える、ことを特徴とする請求項4記載の顕微鏡装置。

【請求項6】 前記試料に照射される前記第1の照射光の強度を調整する第1の照射強度調整手段を更に備える、ことを特徴とする請求項1記載の顕微鏡装置。

【請求項7】 前記試料に照射される前記第2の照射光の強度を調整する第2の照射強度調整手段を更に備える、ことを特徴とする請求項6記載の顕微鏡装置。

【請求項8】 前記第1の照射光の通過および遮断の制御を行う第1の照射制御手段を更に備える、ことを特徴とする請求項1記載の顕微鏡装置。

【請求項9】 前記第2の照射光の通過および遮断の制御を行う第2の照射制御手段を更に備える、ことを特徴とする請求項8記載の顕微鏡装置。

【請求項10】 前記第1および前記第2の照射光の双方または何れか一方の強度を測定する照射強度測定手段を更に備える、ことを特徴とする請求項1記載の顕微鏡装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、顕微鏡下で試料に照射光を照射することにより、例えば、ケージド試薬の分解、細胞破壊、光ピンセット、蛍光褪色回復などを行

う顕微鏡装置に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】従来より、顕微鏡下で、試料に照射光を照射してその試料から発生する散乱光や蛍光を観察するだけでなく、試料に照射光を照射することにより、ケージド試薬を光分解したり、試料を破壊したり、光ピンセットとして試料の一部を移動させたり、或いは、蛍光褪色を回復したりすることが行われている。この従来の顕微鏡では、試料である多数の細胞のうちの1つの細胞または1つの細胞内の局所などのように $\mu\text{m}$ レベルの領域に照射光を照射しようとする場合には、試料観察に使用する対物レンズを通して照射光を試料表面上に集光照射している。ここで、照射光は1回の照射時間に試料上の1点のみに照射される。

【0003】したがって、細胞内の互いに異なる部位それぞれに照射光を照射したい場合や、生体組織内の互いに異なる細胞それぞれに照射光を照射したい場合には、照射光の照射毎に、光学系を調整したり、試料を移動したりすることが行われている。また、走査装置と組み合わせ、照射光を順次に又はランダムに走査することも行われている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記従来技術は、或る1時刻に試料上の1点のみに照射光を照射するものであって、試料上の複数の部位に同時に照射光を照射するものではない。すなわち、試料上の複数の部位それぞれへ照射光を照射しようとする場合には、その複数の部位それぞれに互いに異なる時刻に照射光を照射することになる。したがって、例えば、ケージド試薬を用いて異なる2つの細胞それぞれに存在する分子の量を同時に増加させることはできず、互いに離れた2つの細胞を同時に破壊することはできず、光ピンセットとして複数の部位を同時に移動させることはできず、また、複数の部位の蛍光褪色を同時に回復することもできない。

【0005】本発明は、上記問題点を解消する為になされたものであり、試料上の互いに異なる複数の部位に照射光を同時に集光照射することができる顕微鏡装置を提供することを目的とする。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明に係る顕微鏡装置は、(1) 試料に照射すべき光束を出力する照射用光源と、(2) 照射用光源から出力された光束を分岐して第1の照射光および第2の照射光を出力する分岐光学系と、(3) 第1および第2の照射光それぞれを入力し視野領域内の試料上の2点それぞれに集光照射させる対物レンズと、(4) 対物レンズに入射した試料からの光像を検出する検出光学系と、を備えることを特徴とする。この顕微鏡によれば、試料に照射すべき第1および第2の照射光は、照射用光源から出力された光束が分岐光学系により

分岐されて出力され、対物レンズに入力し、その視野領域内の試料上の2点それぞれに集光照射される。対物レンズに入射した試料からの光像は、検出光学系により検出される。

【0007】試料に照射すべき励起光を出力する励起用光源と、励起光を試料に照射する励起光学系と、を更に備え、検出光学系は、試料から発生した蛍光を検出することとしてもよい。この場合には、励起用光源から出力された励起光は、励起光学系を経て、第1および第2の照射光が照射された試料に照射され、これに伴って試料から発生した蛍光は、検出光学系により検出される。

【0008】試料に照射すべき照明光を出力する照明用光源と、照明光を試料に照射する照明光学系と、を更に備え、検出光学系は、照明光が試料に照射されて発生した透過光または散乱光を検出することとしてもよい。この場合には、照明用光源から出力された照明光は、照明光学系を経て、第1および第2の照射光が照射された試料に照射され、これに伴って試料から発生した透過光または反射光は、検出光学系により検出される。

【0009】試料上の第1の照射光の照射位置を調整する第1の照射位置調整手段を更に備えてもよいし、これに加えて、試料上の第2の照射光の照射位置を調整する第2の照射位置調整手段を更に備えてもよい。この場合には、試料上の第1および第2の照射光それぞれの照射位置が第1および第2の照射位置調整手段それぞれにより調整されるので、第1および第2の照射光それぞれを試料上の所望の位置に照射することができる。

【0010】試料に照射される第1の照射光の強度を調整する第1の照射強度調整手段を更に備えてもよいし、これに加えて、試料に照射される第2の照射光の強度を調整する第2の照射強度調整手段を更に備えてもよい。この場合には、試料に照射される第1および第2の照射光それぞれの強度が第1および第2の照射強度調整手段それぞれにより調整されるので、第1および第2の照射光それぞれを試料に所望の強度で照射することができる。

【0011】第1の照射光の通過および遮断の制御を行う第1の照射制御手段を更に備えてもよいし、これに加えて、第2の照射光の通過および遮断の制御を行う第2の照射制御手段を更に備えてもよい。この場合には、第1および第2の照射光それぞれの通過および遮断が第1および第2の照射制御手段それぞれにより制御されるので、第1および第2の照射光それぞれを必要な時だけ試料に照射することができる。

【0012】第1および第2の照射光の双方または何れか一方の強度を測定する照射強度測定手段を更に備えてもよい。この場合には、試料に照射される第1および第2の照射光それぞれの強度が照射強度測定手段により測定され監視される。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、添付図面を参照して本発明の実施の形態を詳細に説明する。尚、図面の説明において同一の要素には同一の符号を付し、重複する説明を省略する。図1は、本発明に係る顕微鏡装置の構成図である。

【0014】照射用光源10は、試料50に照射すべき照射光を出射するものであり、例えば、Arイオンレーザ光源やNd:YAGレーザ光源などのレーザ光源が好適に用いられる。分岐光学系20は、この照射用光源10から出射された照射光を入力し、照射光Aおよび照射光Bに2分岐する。なお、この分岐光学系20の具体的な構成については後述する。分岐光学系20から出射された照射光AおよびBは、集光レンズ31を経て顕微鏡本体に入射して、ダイクロイックミラー35を透過し、ダイクロイックミラー41により反射され、対物レンズ42に入射する。この対物レンズ42は、試料ステージ43に置かれた試料50の視野領域内の2点それぞれに、照射光AおよびBそれぞれを集光照射する。

【0015】対物レンズ42の視野領域内の試料50の2点に同時照射された照射光AおよびBそれぞれは、その2点のケージド試薬を同時に光分解したり、試料中の2点を破壊したり、光ピンセットとして試料の2点を同時に移動させたり、或いは、蛍光褪色を2点同時に回復したりするものである。また、照射光AおよびBそれぞれは、目的に応じてパルス光でも連続光でもよい。

【0016】一方、励起用光源32は、試料50に含まれる蛍光物質を励起するための励起光Cを出射するものであり、レーザ光源、キセノンランプ、水銀ランプなどが好適に用いられる。この励起用光源32から出射された励起光Cは、励起光学系を経て試料50に照射される。すなわち、励起光Cは、集光レンズ33により集光され、バンドパスフィルタ34により励起波長成分のみが透過され、その後、顕微鏡に入射して、ダイクロイックミラー35により反射され、ダイクロイックミラー41により反射され、対物レンズ42に入射する。そして、対物レンズ42は、試料ステージ43に置かれた試料50の視野領域に励起光Cを集光照射し、試料50に含まれる蛍光物質を励起して蛍光Eを発生させる。また、照明用光源45は、試料50に照射すべき照明光Dを出射するものであり、集光レンズ（照明光学系）46は、この照明光Dを試料50に集光照射する。

【0017】励起光Cが試料50に照射されて発生した蛍光E、および、照明光Dが試料50に照射されて透過した透過光Fそれぞれは、検出光学系により検出される。すなわち、蛍光Eおよび透過光Fそれぞれは、対物レンズ42に入力し、ダイクロイックミラー41を透過し、バンドパスフィルタ44により所定波長成分のみが透過され、反射鏡61により反射され、テレビカメラ62の撮像面上に結像されて、テレビカメラ62により撮像される。テレビカメラ62により撮像された蛍光Eま

たは透過光Fの像は、画像処理部63を経てモニタ部64に表示され、また、画像処理部63により画像処理(例えば、蛍光Eの強度分布の疑似カラー化、透過光Fの光像の輪郭強調)された後にモニタ部64に表示され、さらに、データ解析部65により種々の解析(例えば、試料50上の或点で発生した蛍光Eの強度の時間変化の算出)がなされる。

【0018】以上のように、ダイクロイックミラー35は、照射光AおよびBを透過させ、励起光Cを反射させるものである。ダイクロイックミラー41は、照射光AおよびBならびに励起光Cを反射させ、蛍光Eおよび透過光Fを透過させるものである。また、対物レンズ42は、照射光AおよびBそれぞれを試料50の視野領域内の2点それぞれに集光照射し、励起光Cを試料50の視野領域に集光照射し、試料50の視野領域から発生した蛍光Eおよび透過光Fそれぞれを入力してテレビカメラ62へと導くものである。

【0019】この顕微鏡装置によれば、照射用光源10から出射され分岐光学系20を経た照射光AおよびB、励起用光源32から出射された励起光C、ならびに、照明用光源45から出射された照明光Dそれぞれが試料50に照射され、また、試料50から発生した蛍光Eおよび透過光Fそれぞれが検出光学系を経てテレビカメラ62により撮像されモニタ部64により表示される。

【0020】したがって、例えば、励起用光源32から励起光Cを出射しないで、照明用光源45から出射された照明光Dを試料50に照射するとともに、照射用光源10から出射され分岐光学系20により分岐された照射光AおよびBそれぞれを試料50上の2点それぞれに照射すれば、モニタ部64の表示により、試料50からの透過光Fにより試料50を観察しながら、照射光AおよびBそれぞれの試料50上の照射位置を確認し調整することができる。

【0021】また、照射用光源10から照射光AおよびBを出射しないで、照明用光源45から出射された照明光Dを試料50に照射するとともに、励起用光源32から出射された励起光Cを試料50に照射すれば、モニタ部64の表示により、試料50からの透過光Fにより試料50を観察しながら、その試料50における蛍光Eの発生位置を確認することができる。それ故、試料50が生体試料のように観察中に運動する場合であっても、試料50における蛍光Eの発生位置や強度分布を正確に確認することが可能である。

【0022】次に、本発明に係る顕微鏡装置の分岐光学系20の好適な1例について説明する。図2は、分岐光学系の1例の構成図である。

【0023】照射用光源10から出射された照射光は、分岐光学系20に入射して、まず、ハーフミラー21により2分岐される。2分岐された一方の照射光Aは、反射光22Aにより反射され、シャッタ23Aを経て、減

光フィルタ24Aを所定の透過率で透過し、ハーフミラー26に入射する。また、他方の照射光Bは、反射光22Bにより反射され、シャッタ23Bを経て、減光フィルタ24Bを所定の透過率で透過し、ハーフミラー26に入射する。そして、ハーフミラー26に入射した照射光AおよびBそれぞれは、一部が反射され、残部が透過する。ハーフミラー26で透過した照射光Aおよび反射した照射光Bそれぞれは、分岐光学系20から出射され、集光レンズ31に入射し、さらに顕微鏡本体に入射する。

【0024】ここで、反射鏡(照射位置調整手段)22Aおよび22Bそれぞれは、その傾きを可変に設定することが可能であって、その傾きに応じて、照射光AおよびBそれぞれが試料50上に照射される位置を調整することができる。シャッタ(照射制御手段)23Aおよび23Bそれぞれは、それが開いているときには照射光AおよびBそれぞれを通過させて試料50上に照射し、閉じているときには照射光AおよびBそれぞれを遮断し試料50上に照射させない。これらシャッタ23Aおよび23Bは、同一タイミングに開閉すれば照射光AおよびBを同時刻に試料50上に照射することができ、また、必要に応じて、互いに所要時間だけずらして開閉すれば照射光AおよびBを該所要時間だけずらして試料50上に照射することができる。また、減光フィルタ(照射強度調整手段)24Aおよび24Bそれぞれは、照射光AおよびBそれぞれの試料50上に照射される強度を調整するものである。

【0025】また、ハーフミラー26で反射した照射光Aおよび透過した照射光Bそれぞれは、分岐光学系20から出射され、フォトメータ(照射強度測定手段)28に入射して光量が測定され、その測定値から、試料50に照射された照射光Aおよび照射光Bそれぞれの強度を求めることができる。

【0026】次に、本発明に係る顕微鏡装置の分岐光学系20の好適な他の例について説明する。図3は、分岐光学系の他の例の構成図である。

【0027】照射用光源10から出射された照射光は、分岐光学系20に入射して、まず、1/2波長板29により偏光面が回転され、ハーフミラー21により2分岐される。2分岐された一方の照射光Aは、反射光22Aにより反射され、シャッタ23Aを経て、1/2波長板25Aにより偏光面が回転され、偏光ビームスプリッタ27に入射する。また、他方の照射光Bは、反射光22Bにより反射され、シャッタ23Bを経て、1/2波長板25Bにより偏光面が回転され、偏光ビームスプリッタ27に入射する。

【0028】この偏光ビームスプリッタ27は、入射した光の偏光方位に応じて光を反射または透過するものであり、例えば、誘電体偏光膜を使用したものや、結晶を使用したグランレーザプリズムなどが用いられる。した

がって、偏光ビームスプリッタ27に入射した照射光AおよびBそれぞれは、一部が反射され、残部が透過する。すなわち、偏光ビームスプリッタ27で透過した照射光Aの第1の偏光成分および反射した照射光Bの第2の偏光成分それぞれは、分岐光学系20から出射され、集光レンズ31に入射し、さらに顕微鏡本体に入射する。なお、第1および第2の偏光成分とは、一方がp偏光成分を、他方がs偏光成分を表している。

【0029】ここで、反射鏡（照射位置調整手段）22Aおよび22Bならびにシャッタ（照射制御手段）23Aおよび23Bそれぞれは、図2で説明したものと同様のものである。また、1/2波長板（照射強度調整手段）25Aおよび25Bそれぞれは、図1の減光フィルタ24Aおよび24Bそれぞれと同様に、照射光AおよびBそれぞれの試料50上に照射される強度を調整するものである。すなわち、1/2波長板25Aから出射される照射光Aの偏光状態に応じて、偏光ビームスプリッタ27で透過する割合が異なり、また、1/2波長板25Bから出射される照射光Bの偏光状態に応じて、偏光ビームスプリッタ27で反射される割合が異なる。このように、1/2波長板25Aおよび25Bそれぞれを用いて試料50に照射される照射光AおよびBそれぞれの強度を調整する場合には、偏光ビームスプリッタ27における照射光AおよびBそれぞれの損失を抑えることが可能で、照射光AおよびBそれぞれを試料50に効率よく照射することができる。

【0030】また、偏光ビームスプリッタ27で反射した照射光Aの第2の偏光成分および透過した照射光Bの第1の偏光成分それぞれは、分岐光学系20から出射され、フォトメータ（照射強度測定手段）28に入射して光量が測定され、その測定値から、試料50に照射された照射光Aおよび照射光Bそれぞれの強度を求めることができる。

【0031】次に、本発明に係る顕微鏡装置を用いた実験例について説明する。ここでは、照射光AおよびBそれぞれは、ケージド試薬を光分解する分解光として作用している。

【0032】実験系および実験条件は以下のとおりである。照射用光源10として、Arイオンレーザ光源（波長351nm、連続発振、電磁シャッタ1/16秒）、または、Nd:YAGレーザ光源（波長355nm、パルス発振、パルス幅5ns）を用いた。分岐光学系20として図2に示す構成のものを採用し、照射用光源10から出射された光束を分岐光学系20により分岐して照射光AおよびBとした。対物レンズ42は倍率100倍のものを用了。試料50は培養細胞（NG108-15）であり、この試料50に、照射光AおよびBそれぞれの照射に伴って光分解してCa<sup>2+</sup>イオンを放出するケージド試薬 caged Ca<sup>2+</sup> (o-nitrophenyl-EGTA/AM) を導入し、また、Ca<sup>2+</sup>イオンを検出するための蛍光試薬として flu

o-3/AMを導入した。

【0033】試料50上に照射された照射光AおよびBそれぞれのスポットを、対物レンズ42等からなる検出光学系を経てテレビカメラ62で撮像しモニタ部64で観察したところ、照射光AおよびBそれぞれの照射径は約1μmであった。また、反射鏡22Aおよび22Bそれぞれの傾きを調整することにより、照射光AおよびBそれぞれの試料50上の照射位置を調整することができることが確認できた。

【0034】互いに異なる2つの細胞それぞれに照射光AおよびBそれぞれを同時照射した後、励起用光源32から出射された励起光Cを試料50に照射して、蛍光試薬から発生した蛍光Eを対物レンズ42等からなる検出光学系を経てテレビカメラ62で撮像しモニタ部64で観察したところ、照射光AおよびBそれぞれが照射された2つの細胞それぞれではケージド試薬が光分解されてCa<sup>2+</sup>が増加しているが、それら以外の細胞ではCa<sup>2+</sup>が増加していないことが確認できた。また、その後も細胞に励起光Cを照射し蛍光Eを観察し続けたところ、照射光AおよびBそれぞれが照射された2つの細胞からの蛍光Eの強度は次第に減少し、それら以外の細胞からの蛍光Eは僅かに増加した。これは、照射光AおよびBの照射により2つの細胞で増加したCa<sup>2+</sup>が、それら以外の細胞へ拡散していったものと考えられる。

【0035】また、単一の細胞内の2点それぞれに照射光AおよびBそれぞれを同時照射した後、励起用光源32から出射された励起光Cを試料50に照射して、蛍光試薬から発生した蛍光Eを対物レンズ42等からなる検出光学系を経てテレビカメラ62で撮像しモニタ部64で観察したところ、照射光AおよびBそれぞれが照射された細胞内の2点それぞれではケージド試薬が光分解されてCa<sup>2+</sup>が増加しているが、それら以外の領域ではCa<sup>2+</sup>が増加していないことが確認できた。また、その後も細胞に励起光Cを照射し蛍光Eを観察し続けたところ、照射光AおよびBそれぞれが照射された細胞内の2点からの蛍光Eの強度は次第に減少し、その周辺では蛍光強度が次第に強くなり、やがて、細胞からの蛍光Eの発生は均一化していく傾向が認められた。これは、照射光AおよびBの照射により局所的に増加したCa<sup>2+</sup>がその細胞内に拡散していくことに因るものと考えられる。

【0036】さらに、照明用光源45からの照明光Dを試料50に照射し、その透過光Fの光像をテレビカメラ62により撮像しモニタ部64に表示させることで、細胞の形状を確認するとともに、その細胞中における蛍光発生位置を確認することができた。

【0037】本発明は、上記実施形態に限定されるものではなく種々の変形と適用が可能である。例えば、図1に示す実施形態では、照明光Dを試料50に照射して試料50からの透過光Fを観察する透過型の顕微鏡であったが、試料50からの反射光を観察する反射型の顕微鏡



でもよい。

【0038】また、上記の実験例では、照射光AおよびBは、試料50に導入されたケージド試薬を光分解する分解光として用いられたが、試料中を破壊したり、光ピンセットとして試料の一部を移動させたり、或いは、蛍光褪色を回復したりする場合にも、本発明に係る顕微鏡装置は有効である。なお、照射光AおよびBは、目的に応じて、その波長や強度、連続出力かパルス出力かが最適に設定される。

#### 【0039】

【発明の効果】以上、詳細に説明したとおり本発明によれば、試料に照射すべき第1および第2の照射光は、照射用光源から出力された光束が分岐光学系により分岐されて出力され、対物レンズに入力し、その視野領域内の試料上の2点それぞれに集光照射され、一方、対物レンズに入射した試料からの光像は、検出光学系により検出される。このような構成としたので、対物レンズの視野内の2点に照射光を同時に照射することができるので、その2点に同時に光刺激を与え、その後の反応を解析することが可能となる。

【0040】また、励起用光源から出力された励起光は、励起光学系を経て、第1および第2の照射光が照射された試料に照射され、これに伴って試料から発生した蛍光は、検出光学系により検出される。このような構成としたので、第1および第2の照射光が照射された試料上の位置およびその周辺の領域から発生した蛍光を検出することができる。

【0041】また、照明用光源から出力された照明光は、照明光学系を経て、第1および第2の照射光が照射された試料に照射され、これに伴って試料から発生した透過光または反射光は、検出光学系により検出される。このような構成としたので、透過光像により試料を観察しながら、その試料中の所望位置に第1および第2の照射光を照射することができ、また、その試料中の蛍光発生分布を解析することができる。

【0042】したがって、例えば、神経細胞のようにネットワークを構成している細胞群にケージド試薬を導入し、そのうちの2つの細胞に照射光を同時照射することで同時に活性化させ、細胞群内の他の細胞の反応を検出することができ、そして、このような2つの細胞を同時に活性化した場合と1つの細胞のみを活性化した場合とで反応の差異を解析することが可能となる。一般に、生体内の細胞の活性の制御は、複数の細胞の活動が互に影響しあっている場合が多く、このように複数の細胞の間の情報伝達等に関する解析に本発明は有効である。

【0043】また、対物レンズの倍率に依っては、細胞の大きさよりも照射光の光束径を細くすることができる

ので、1つの細胞内の互いに異なる2点それぞれに同時に照射光を照射し光刺激を行うことができる。例えば、1つの細胞内での分子の配置や移動経路あるいは活性状態が空間的に異なることで、細胞としての機能の発現の程度や方向性（例えば、突起を伸ばす方向、情報分子を放出する方向）が決定されると考えられているが、本発明によれば、ケージド試薬が導入された細胞内の異なる2点（例えば、細胞膜付近と核内）に同時に照射光を照射して活性化することで、その細胞の機能を解析することができる。

【0044】さらに、本発明によれば、試料上の第1および第2の照射光それぞれの照射位置が第1および第2の照射位置調整手段それぞれにより調整されるので、第1および第2の照射光それぞれを試料上の所望の位置に照射することができる。また、試料に照射される第1および第2の照射光それぞれの強度が第1および第2の照射強度調整手段それぞれにより調整されるので、第1および第2の照射光それぞれを試料に所望の強度で照射することができる。また、第1および第2の照射光それぞれの通過および遮断が第1および第2の照射制御手段それぞれにより制御されるので、第1および第2の照射光それぞれを必要な時だけ試料に照射することができる。また、試料に照射される第1および第2の照射光それぞれの強度が照射強度測定手段により測定され監視される。このような構成とすることで、第1および第2の照射光それぞれを、試料上の任意の2点に、任意の強度で、任意の時刻に照射することができるので、本発明に係る顕微鏡装置は、上述した細胞の諸機能の解明に極めて有効である。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係る顕微鏡装置の構成図である。

【図2】分岐光学系の1例の構成図である。

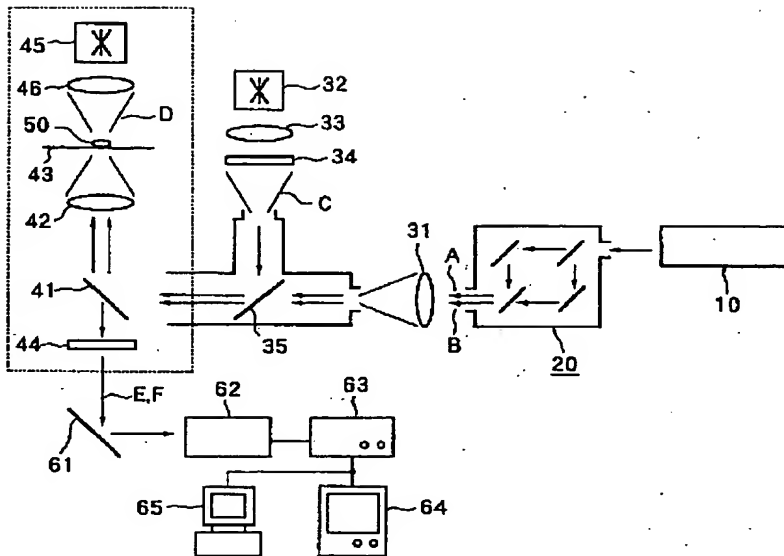
【図3】分岐光学系の他の例の構成図である。

#### 【符号の説明】

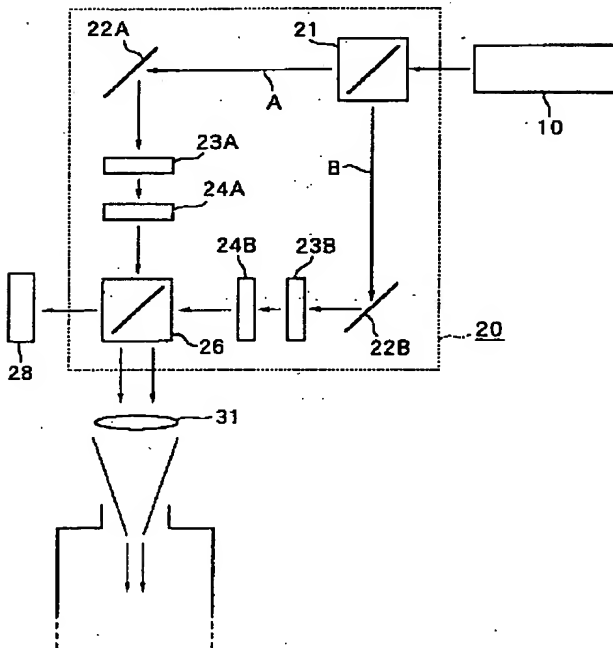
10…照射用光源、20…分岐光学系、21…ハーフミラー、22A、22B…反射鏡、23A、23B…シヤッタ、24A、24B…減光フィルタ、25A、25B…1/2波長板、26…ハーフミラー、27…偏光ビームスプリッタ、28…フォトメータ、29…1/2波長板、31…集光レンズ、32…励起用光源、33…集光レンズ、34…バンドパスフィルタ、35…ダイクロイックミラー、41…ダイクロイックミラー、42…対物レンズ、43…試料ステージ、44…バンドパスフィルタ、45…透過用光源、46…集光レンズ、50…試料、61…反射鏡、62…テレビカメラ、63…画像処理部、64…モニタ部、65…データ解析部、A、B…照射光、C…励起光、D…照明光、E…蛍光、F…透過光。



【図1】



【図2】



【図3】

